

REPUBLICQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID – TLEMCEM

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

Laboratoire de Recherche Chimie Analytique et d'Electrochimie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du

Diplôme de Master

Filière : Chimie

Option : Chimie physique et analytique

Présenté par : Guennoun Ibtissem

Thème

Dosage d'un principe actif dans un médicament par techniques chromatographique (HPLC) et spectroscopique (uv-visible)

Soutenu : Octobre 2017 devant les membres de jury :

Président : Larabi Lacène	Professeur	UAB de Tlemcen
Examineur : Dahmani Benamar	Professeur	UAB de Tlemcen
Encadreur : Harek Yahia	Professeur	UAB de Tlemcen

DEDICACES

Je dédie ce travail

À mon père

À ma mère

À mon frère et mes

sœurs

Et à tous ceux qui me

sont chers

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier Dieu le tout puissant, de m'avoir permis d'arriver à ce niveau d'études, et aussi pour m'avoir donné beaucoup de patiences et de courages.

J'adresse mes vifs remerciements à mon Encadreur Pr HAREK Yahia Pour m'avoir constamment guidé tout au long de mon travail.

Aussi, Je tiens à remercier, le président de jury, Pr LARABI Lacène, et l'examineur, Pr DAHMANI Benamar, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail.

Je remercie également tout les membres du laboratoire de Recherche CHIMIE ANALYTIQUE ET D'ELECTROCHIMIE, où j'ai accompli ce travail, pour leurs aides et leurs conseils.

Ainsi, j'attache mes sincères remerciements à tous mes camarades qui m'ont soutenue.

RESUME

Les médicaments à base de Paracétamol ou de Caféine sont disponibles sous différentes formes pharmaceutiques. Actuellement, le dosage de ces principes actifs se fait par des méthodes variées ; nous avons utilisé dans ce travail deux techniques analytiques simples et rapides qui nous ont permis de doser ces deux derniers.

L'objectif d'une telle démarche est d'aider les laboratoires et les spécialistes en industrie à contrôler les médicaments pharmaceutiques, à réduire le temps et le coût de l'analyse et par la suite à minimiser les rejets chimiques.

Ce manuscrit est repartie en trois chapitres, le premier est consacré à une étude bibliographique sur : les substances actives (paracétamol et caféine), les médicaments, la chromatographie liquide à haute performances (HPLC) , l'UV-Visible , et finalement la validation analytique d'une méthode de dosage ; le deuxième chapitre est consacré aux conditions expérimentales et matériel , et le troisième chapitre est consacrée au traitement des résultats et discussions ainsi à l'optimisation et la validation des deux techniques utilisées.

Dans le cadre de ce travail, nous avons pu optimiser les conditions chromatographiques et spectrophotométrique , qui nous ont permis de vérifier la quantité des principes actifs contenus dans différents médicaments et les comparés avec ceux qui sont indiqués sur les boites ;ensuite nous avons valider les deux méthodes « chromatographique (HPLC) et spectroscopique (UV-Visible) ».

Les résultats obtenus ont été dans les normes.

ABSTRACT

Drugs based on paracetamol or caffeine are available in various pharmaceutical forms. At the present time, the dosage of these active principles in the finished products is carried out by various methods, we propose two simple and rapid analytical methods allowing the dosage of these two molecules in all its pharmaceutical forms. The objective of this approach is to help laboratories and industry specialists to control pharmaceutical drugs, reduce the time and cost of analysis, and subsequently minimize chemical releases. This manuscript is divided into three chapters. The first is devoted to a bibliographic study on active substances (paracetamol and caffeine), drugs, high performance liquid chromatography (HPLC),

UV-Visible, and finally the validation of analytical methods ,The second chapter is devoted to the experimental conditions and materials, and the third chapter is devoted to the treatment of the results and discussions and to the optimization and validation of methods which are used. In this work, we were able to optimize the chromatographic and spectrophotometric conditions, which allowed us to check the quantity of the active principle contained in different drugs and compared them with those indicated on the boxes. Then, we validated the two methods "chromatographic (HPLC) and spectroscopic (UV-Visible)".

The results obtained have been on norms

ملخص

الأدوية القائمة أساسا على الباراسيتامول أو الكافيين تتوفر حاليا في أشكال صيدلانية مختلفة و لمعايرة هاتين المادتين الفعاليتين نحن نقترح طريقتين تحليليتين سهلتين و سريعتين و هما الكروماتوغرافيا السائلة ذات الكفاءة العالية و التحليل الطيفي في مجال الأشعة فوق البنفسجية و المرئية.

الهدف من هذا العمل هو مساعدة المخابر و المختصين في مجال الصناعة من التحقق من جودة الأدوية، المحافظة على الوقت و التقليل من الخسائر المادية و النفايات الكيميائية

هذه المذكرة تنقسم إلى ثلاثة فصول الأول يقوم على دراسة نظرية و بعض التعريفات أما الثاني فينص على الشروط اللازمة لكل تجهيز و أخيرا الفصل الثالث يقوم على تحليل النتائج و مناقشتها

Liste des tableaux

Tableau II. 1 : Conditions expérimentales suivies en HPLC

Tableau II.2 : Conditions expérimentales suivies en UV-Visible

Tableau II.3 : Les pesées de 10 comprimés / gélules des différents médicaments

UV-Visible : Caféine

Tableau III.1 : Résultats du test de linéarité de la caféine

Tableau III.2 : Test d'homogénéité des variances

Tableau III.3 : Test de l'existence d'une pente significative

UV-Visible : Paracétamol

Tableau III.4 : Résultats du test de linéarité de paracétamol

Tableau III.5 : Test de l'homogénéité des variances

Tableau III.6 : Test de l'existence d'une pente significative

Tableau III.7 : Pesées des principes actifs calculées

Tableau III.8 : Résultats du test de répétabilité de la caféine

Tableau III.9 : Résultats du test de répétabilité du paracétamol

HPLC : Caféine

Tableau III.10 : Résultats du test de linéarité de la caféine

Tableau III.11 : Test d'homogénéité des variances

Tableau III.12 : Test de l'existence d'une pente significative

HPLC : Paracétamol

Tableau III.13 : Résultats du test de linéarité de paracétamol

Tableau III.14 : Test de l'homogénéité des variances

Tableau III.15 : Test de l'existence d'une pente significative

Tableau III.16 : Pesées des principes actifs calculées

Tableau III.17 : Résultats du test de répétabilité de la caféine

Tableau III.18 : Résultats du test de répétabilité du paracétamol

Liste des figures

Figure I.1 : Structure chimique du Paracétamol

Figure I.2 : Structure chimique de la caféine

Figure I.3 : Un spectre UV-Visible

Figure I.4 : Principe de spectrophotomètre uv-visible

Figure I.5 : Loi de Beer Lambert

Figure I.6 : Schéma de principe d'une chaîne d'HPLC

Figure II.1 : Photo de l'HPLC utilisé au laboratoire

Figure II.2 : Photo de l'UV-Visible utilisé au laboratoire

Figure II.3 : Photo de la balance analytique utilisée au laboratoire

Figure II.4 : Absorbance maximale du Paracétamol

Figure II.5 : Absorbance maximale du Caféine

Figure III.1: La représentation des trois gammes d'étalonnage exprimant la concentration de la caféine en fonction de l'absorbance

Figure III.2 : La représentation des trois gammes d'étalonnage exprimant la concentration du paracétamol en fonction de l'absorbance

Figure III.3: La représentation des trois gammes d'étalonnage exprimant la concentration de la caféine en fonction de l'air de pic

Figure III.4: La représentation des trois gammes d'étalonnage exprimant la concentration du Paracétamol en fonction de l'air de pic

Liste des abréviations

OMS	Organisation mondiale de la santé
ICH	The International Conference on Harmonisation
PA	Principe Actif
P	Paracétamol
C	Caféine
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
UV	Ultra violet
SM	Solution mère
SF	Solution fille
M	Moyenne
CV	Coefficient de variation
LD	Limite de détection
LQ	Limite de quantification

SOMMAIRE

Introduction.....	1
Chapitre I :Partie bibliographique.....	2
I.1.Généralités.....	3
I.2.Méthodes de dosage.....	4
I.2.1.Spectroscopie UV-Visible.....	4
I.2.2.Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	6
I.3.Validation d'une méthode d'analyse.....	9
III.3.Critères de la validation d'une méthode de dosage.....	9
Chapitre II : Matériel et conditions expérimentales.....	11
II.1.Introduction.....	12
II.2.Appareillage.....	12
II.3.Etalons, Produits finis et Réactifs.....	13
II.4.Conditions expérimentales suivies dans chaque méthode.....	13
II.4.1.Conditions expérimentales suivies en HPLC.....	13
II.4.2.Conditions expérimentales suivies en UV-Visible.....	13
II.5.Optimisation des méthodes.....	14
II.5.1.Optimisation chromatographique.....	14
II.5.2.Optimisation spectrophotométrique.....	14
II.6.Mode opératoire.....	15
II.6.1.Préparation des standards.....	15
II.6.2.Préparation des solutions essais	16
Chapitre III : Résultats et discussions.....	17
III.1.Validation des techniques analytiques.....	18
III.1.1.Technique spectroscopique UV-Visible	18
II.1.2.Technique chromatographique HPLC	25
Conclusion.....	31

Introduction :

La qualité des médicaments est actuellement au cœur de tous les débats concernant la santé publique, surtout après l'apparition des contrefaçons d'une manière inimaginable et l'estimation de l'Organisation Mondiale de la Santé que 25% des médicaments utilisés dans les pays en voie de développement sont de faux médicaments ou sont de qualité inférieure ; ce qui a poussé les laboratoires à condenser le travail d'analyse par différentes méthodes pour assurer la sécurité de la santé publique.

La mauvaise qualité des médicaments peut être de deux types:

- Falsification volontaire en cas, par exemple, d'absence du principe actif, de présence d'une quantité inférieure à celle annoncée et de remplacement du principe actif par une autre substance, etc.

- Mauvaise fabrication, c'est le cas notamment, s'il y a une répartition non homogène du principe actif sur un même lot et un temps de délitement trop important etc. [1]

Or selon L'OMS « Un médicament contrefait est un médicament qui est délibérément et frauduleusement muni d'une étiquette n'indiquant pas son identité et/ou sa source véritable. Il peut s'agir d'une spécialité ou d'un générique. Parmi les produits contrefaits, certains contiennent des bons ingrédients ou des mauvais ingrédients, ou manquent totalement de principe actif. Dans d'autres cas, le principe actif est en quantité insuffisante ou le conditionnement est falsifié. » [2].

Le but de ce travail consiste, dans le cadre du contrôle de qualité d'un médicament, à vérifier la quantité de principe actif (caféine/paracétamol) contenu dans un médicament et la comparée avec celle qui est indiquée sur la boîte, ainsi d'optimiser et valider une méthode analytique simple rapide et économique permettant le dosage du Paracétamol et de la Caféine.

Ce travail est présenté sous forme de trois chapitres:

* Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique.

*Le deuxième chapitre est consacré au matériel et conditions expérimentales.

*Le troisième chapitre est consacré au traitement des résultats et discussions.

Chapitre I
Recherche bibliographique

I.1-Généralités :

➤ Définitions du médicament :

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), un médicament s'agit de « toute substance ou produit utilisé ou destiné à être utilisé en vue de modifier ou d'étudier un système physiologique ou un état pathologique dans l'intérêt du sujet auquel il est administré ».

D'après le code de la santé publique (1967), un médicament est « toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques ». [3]

➤ Principe actif (PA) :

Substance comprise dans un produit médicamenteux, ayant une action thérapeutique et qui comparée aux excipients, se trouve en petite quantité. [4]

➤ Le Paracétamol :

Le Paracétamol, aussi appelé acétaminophène, est un composé chimique utilisé comme antalgique (anti -douleur) et antipyrétique (anti-fièvre), qui figure parmi les principes actifs les plus utilisés et prescrits au monde. [5]

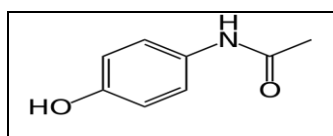


Figure I.1 : structure chimique du Paracétamol

➤ La Caféine :

La Caféine est la substance psychoactive la plus consommée au monde, elle est utilisée comme stimulant, en raison de son action sur le système nerveux central et le système cardiovasculaire.

Par fois le Paracétamol est utilisé en association avec la Caféine pour le traitement des crises les plus intenses comme la migraine.

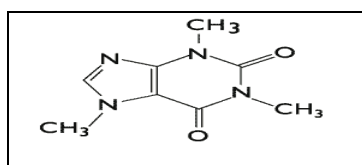


Figure I.2 : structure chimique de la Caféine

I.2-Méthodes de dosage

I.2.1-Spectrophotométrie UV-Visible :

➤ Définition :

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée, généralement en solution grâce à l'interaction matière et rayonnement électromagnétique.

Pour que la mesure soit efficace, il faut effectuer **un balayage sur toutes les longueurs d'ondes** avec une solution contenant l'espèce chimique à analyser. **On se placera à la longueur d'onde pour laquelle l'absorbance est maximale** pour effectuer la mesure [6].

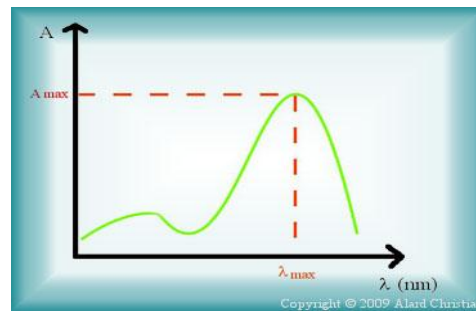


Figure I.3 : Un spectre UV-Visible

➤ PRINCIPE :

On fait interagir une source lumineuse avec une molécule, suivant la longueur d'onde utilisée et la nature de l'échantillon, l'énergie du rayonnement va faire passer des électrons de valences de la molécule à d'autres niveaux énergétiques. Cette énergie sera absorbée et le rayonnement sera en partie stoppé, on parle d'absorbance.

L'absorbance A (sans unité) se calcule grâce à la formule suivante :

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

I_0 : l'intensité incidente

I : l'intensité transmise

L'absorbance est proportionnelle à la concentration et grâce à la loi de Beer-Lambert on peut retrouver la concentration de la substance dans la solution. [7]

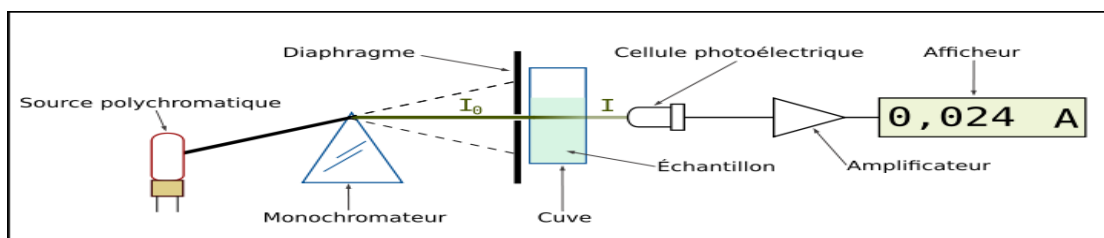


Figure I.4: Principe du spectrophotomètre UV-Visible

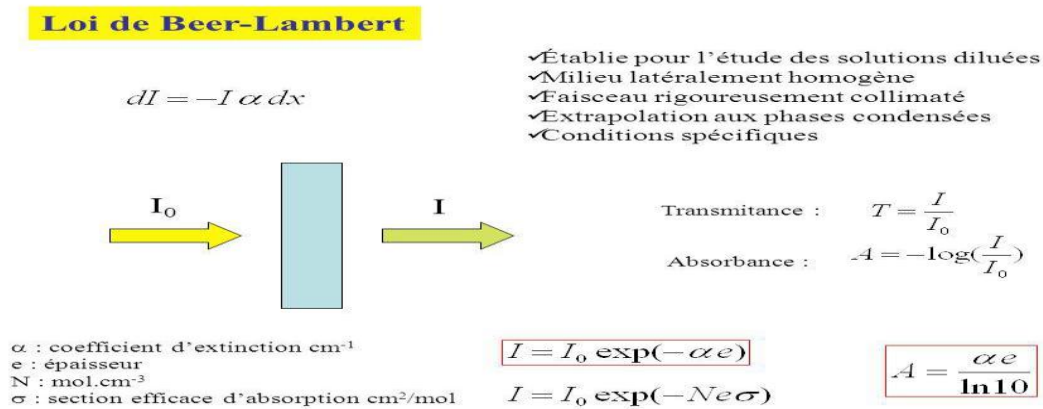


Figure I.5 : Loi de Beer-lambert

➤ Description du spectrophotomètre :

Un spectrophotomètre est composé de trois éléments principaux :

- Un émetteur ;
- Un analyseur ;
- Une cellule de mesure.

• L'émetteur :

Est constitué d'une lampe qui produit le rayonnement lumineux et d'un monochromateur qui « filtre » la lumière pour ne laisser passer qu'une lumière monochromatique .

Il y a généralement deux lampes : une lampe à hydrogène ou à deutérium dont le spectre va de 120 nm à 400 nm et une lampe à filament de tungstène ou à vapeur d'halogène dont le spectre va de 350 nm à 900 nm.

L'association de ces deux lampes permet donc de couvrir tout le spectre du proche UV au visible. Le monochromateur est un système (prisme ou réseau) qui permet de sélectionner à partir d'une lumière polychromatique, une longueur d'onde déterminée.

• L'analyseur :

Est composé d'un système qui permet de transformer un signal lumineux en un signal électrique, lui même converti en valeur numérique lue sur le cadran de mesure.

• La cellule d'analyse :

Est un système qui permet d'intercaler sur le trajet du faisceau lumineux les échantillons à étudier. L'élément principal est une cuve en verre ou en quartz dont le modèle le plus courant est un parallélépipède à base carrée de 1 cm de trajet optique ayant deux faces opposées parfaitement parallèles et transparentes et deux faces dépolies.

La manipulation des cuves se fait toujours par les faces dépolies. Le spectrophotomètre doit avoir une sortie pour le branchement d'un enregistreur afin de pouvoir enregistrer les spectres d'absorption.

NB : Ne jamais utiliser de cuve en verre dans la région du spectre UV pour la raison que le verre absorbe en UV/Visible.

I.2.2-Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

➤ Définition :

La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse.

A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre.

Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression. Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le « P » de pression est devenu le « P » de performance lorsqu'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire, régularité de cette phase...).

➤ Principe :

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique [8]. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

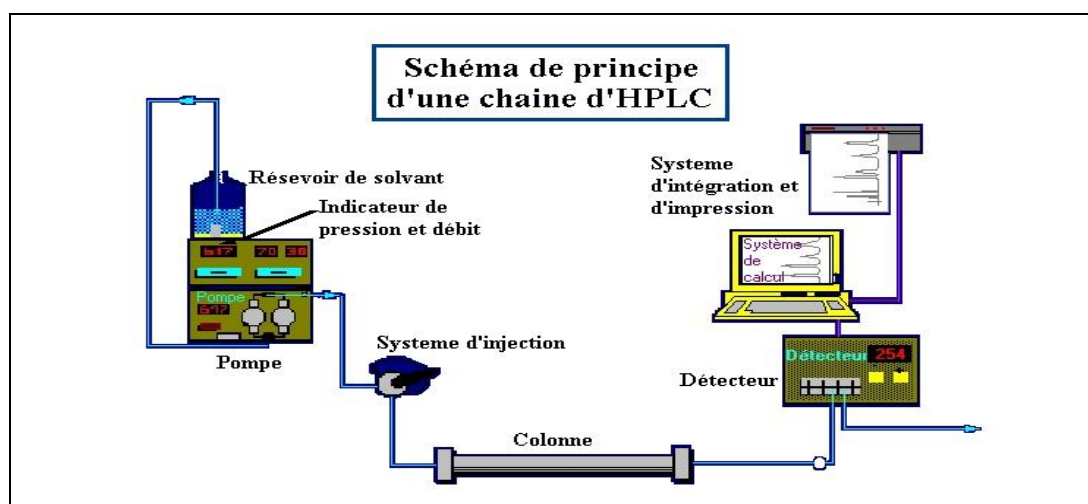


Figure I.6 : Schéma de principe d'une chaîne d'HPLC

➤ **Appareillage :**

L'appareil HPLC comprend différentes parties : un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des éluions graduées, un injecteur, une colonne, un four, un dégazeur, un détecteur et un système d'acquisition de données.

- **Réservoir de la phase mobile :**

Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec extrémité filtrante en téflon. [9] Un réservoir de solvant (éluant) qui contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluant (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluion (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.

L'emploi d'un vase clos permet d'éviter l'évaporation, surtout si l'un des solvants est très volatil et lorsqu'il est nécessaire d'être en présence d'un gaz inerte [10]. Il existe deux modes de travail : isocratique et gradient.

- Mode isocratique, c'est-à-dire la composition de la phase mobile doit rester constante tout au long de l'analyse.

- Mode gradient, c'est-à-dire les constituants du mélange de la phase mobile changent avec le temps.

- **Choix de la phase mobile :**

Il est recommandé de toujours employer des solvants traités spécifiquement (grade HPLC). Ils doivent être dégazés et filtrés avant usage. Le dégazage est effectué par ultra-sons ou par barbotage d'un gaz inerte chimiquement.

Si la phase stationnaire est polaire, on choisit une phase mobile peu polaire : la chromatographie est dite chromatographie en phases normales.

Si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisit une phase mobile polaire, le plus souvent un mélange méthanol/eau ou acétonitrile /eau :

La chromatographie est dite chromatographie à polarité de phase inversée.

- **Pompe :**

Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est caractérisée par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, le débit délivré et la stabilité du flux.

* Débit : 0.01 à 10 ml/min,

* stabilité < 1% (<0.2% pour des chromatographies d'exclusion diffusion)

* Pression maximum 5000 psi

- **Injecteur :**

- ✓ **Injecteur manuel :**

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 µL...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillonnage sans modifier la pression dans la colonne. [9]

✓ **Injecteur automatique :**

Il permet de fixer automatiquement le volume d'injection voulu à l'aide d'un ordinateur et l'injection se fait automatiquement. [9]

• **Colonne :**

Les colonnes d'HPLC sont généralement courtes et droites en acier inoxydable capable de résister aux fortes pressions. La plupart des colonnes ont une longueur de 10 à 30 cm et un diamètre de 4 à 5 mm. Ces colonnes sont remplies de phase stationnaire, maintenue entre deux disques poreux situés aux extrémités et dont la taille des particules varie de 5 à 10 μm . Ce type de colonne offre souvent de 40 000 à 60 000 plateaux par mètre. Le débit de la phase mobile ne peut dépasser quelques mL/min.

La colonne est souvent précédée par une pré-colonne pour augmenter sa durée de vie, dite colonne de garde, courte de 1cm, qui retient les composés indésirables. On change périodiquement cette pré-colonne, bien qu'il soit par ailleurs conseillé de filtrer les échantillons avant l'analyse à travers un filtre de porosité inférieure à 0,5 μm .

• **Détecteurs :**

Les détecteurs ont pour but de fournir un signal électrique reflétant en continu les variations de composition de l'éluant à la sortie de colonne, ce qui permet de détecter les différents composés existant dans l'éluant. Dès lors, le dispositif utilisé dépend de la nature de l'échantillon.

IL existe plusieurs détecteurs:

* Détecteur UV –Visible

* Détecteur à indice de réfraction

* Détecteur stéréochimique.

* Détecteur de radioactivité.

Le détecteur le plus utilisé en HPLC, est le spectromètre d'absorption UV-visible (190-800 nm) relié à la sortie de la colonne.

• **Intégrateur :**

Après la détection du signal sous forme d'un pic, l'intégrateur permet d'intégrer l'aire sous ce pic. L'aire sous le pic est proportionnelle à la quantité du produit à doser.

L'intégration du pic chromatographique, dépend de 2 paramètres : La largeur attendue des pics et le seuil d'intégration (sensibilité).

La largeur de pic est à peu près prévisible en fonctions de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic [9].

I.3. Validation d'une Méthode d'analyse

➤ **Définition :**

Selon la norme ICH (the International Conférence on Harmonisation), la validation d'une méthode est définie comme étant l'ensemble des opérations nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé. [11]

➤ **OBJECTIF :**

L'objectif de la validation d'une méthode analytique, est de démontrer que chaque mesure réalisée ultérieurement en routine sera suffisamment proche de la valeur validée ou dans les limites acceptables selon le besoin de l'analyse. Les critères de la validation sont fixes en fonction de la finalité de la procédure analytique. [12]

I.3.1. Critères de la validation d'une méthode de dosage :

Les critères de validation cités ci-dessous seront donc adaptés à ce type de démarche. Notons qu'il existe des logiciels qui permettent d'effectuer les tests statistiques de vérification de chacun de ces critères.

❖ **Spécificité :**

Une méthode est dite spécifique lorsqu'on a la garantie que le signal mesuré provient uniquement de la substance à analyser. La première partie de la validation est donc d'analyser ces différents composés de l'échantillon individuellement, et de vérifier que l'on n'observe aucune interférence avec le signal du traceur. [13]

❖ **Linéarité :**

Il s'agit de la capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle, d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en traceur à examiner dans l'échantillon. L'intervalle de concentrations à valider est couvert par une série de 5 concentrations au minimum régulièrement espacées contenant le 100%.

❖ **Exactitude :**

Elle exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée, et la valeur trouvée (valeur moyenne) obtenue en appliquant la procédure d'analyse sur un certain nombre de fois [13].

❖ **Fidélité :**

La fidélité de la procédure exprime le degré de dispersion entre une série provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites : les essais effectués sur des produits identiques dans des circonstances présumées identiques, ne conduisent généralement pas à des résultats identiques. Cela est dû à l'existence d'erreurs aléatoires, inhérentes à toute méthode d'essai.

Les facteurs contribuant à la variabilité d'une méthode analytique comprennent :

- L'opérateur ;
- L'équipement utilisé ;
- L'étalonnage de l'équipement ;
- L'environnement (température, humidité, pollution de l'air,...) ;
- Les réactifs.

La fidélité fournit une explication sur les erreurs liées au hasard, elle s'exprime par la mesure de la reproductibilité et de la répétabilité. Ces deux mesures extrêmes de la variabilité sont suffisantes pour convenir à la plupart des cas courants.

La répétabilité se rapporte à des essais de la même grandeur, réalisés dans des conditions aussi stables que possible, dans de courts intervalles de temps, dans un même laboratoire, par le même opérateur employant le même équipement.

La reproductibilité, par contre, se rapporte à des essais réalisés dans des conditions variables, par différents opérateurs et équipements, et à des jours différents.

Le protocole de détermination de ces critères peut être exprimé sous la forme d'un plan expérimental. [13]

❖ **Robustesse :**

L'étude de la robustesse permet de définir les variations admissibles de chacun des paramètres opératoires critiques qui sont sans effet sur la validité des résultats fournis, ces paramètres étant étudiés séparément les uns des autres, ou regroupés. Comme pour l'étude de la linéarité, les essais de détermination de la robustesse sont regroupés sous la forme d'un plan d'expérience. [14]

❖ **Limites de Détection et de Quantification :**

La limite de détection (LD) est la plus petite quantité de la substance ciblée qui peut être détectée, mais pas exactement quantifiée dans un échantillon.

La limite de quantification (LQ) est la plus petite quantité de la substance ciblée dans un échantillon qui peut être déterminée dans des conditions expérimentales prescrites avec une exactitude bien définie.

❖ **Justesse**

Selon la **norme NF ISO 3534**, la justesse est définie comme l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et d'une valeur de référence acceptée. La justesse se mesure, à un niveau donné de concentration, dans la zone quantifiable pratique de la molécule. Elle s'exprime par l'erreur relative.

Toutes les caractéristiques mentionnées ne doivent pas obligatoirement être prises en compte dans tous les cas; il faut donc déterminer dans chaque cas celles qui sont importantes. Toutefois, les principes ci-après sont généralement applicables. [15]

Chapitre II

Matériel et conditions expérimentales

II.1.Introduction :

Dans la partie pratique, nous allons vérifier la quantité du principe actif (caféine/paracétamol) contenu dans un médicament et la comparée avec celle qui est indiquée sur la boîte ; ainsi dans ce volet, nous allons développer les différentes étapes à réaliser pour valider une méthode de dosage du Paracétamol et de la Caféine par différentes techniques (HPLC, UV-Visible).

II.2.Appareillage :

- Un système chromatographique HPLC SHIMADZU est utilisé, ce dernier est constitué d'un logiciel gestionnaire de spectre et un enregistreur de données LC solution.



Figure II.1 : Photo de l'HPLC utilisé au laboratoire

- Un spectrophotomètre SPECTRONIC UNICAM UV 500 constitué d'un logiciel Vision 32



Figure II.2 : Photo de l'UV-Visible utilisé au laboratoire

- Une balance de marque SARTORIUS, sa précision est de l'ordre de 0.01 mg.



Figure II.3 : Photo de la balance analytique utilisée au laboratoire

II.3. Etalons, Produits Finis et Réactifs :

- Standard de Paracétamol (Etalon de travail d'une société pharmaceutique Algérienne).
- Standard de Caféine (Etalon de travail d'une société pharmaceutique Algérienne).
- médicaments a différents dosages sous deux formes (comprimés, gélules) :
 - Paracétamol MYLAN (laboratoire MYLAN) : 1g de Paracétamol / comprimé
 - Doliprane (Laboratoire SANOFI) : 1g de paracétamol/comprimé
 - Lamaline (Laboratoire MYLAN) $\left\{ \begin{array}{l} 300 \text{ mg de paracétamol/gélule} \\ 30 \text{ mg de caféine/gélule} \end{array} \right.$
- Réactif : Méthanol (CH_3OH) grade HPLC (Biochem-chemopharma)

II.4. Conditions expérimentales suivies dans chaque méthode :

II.4.1- Conditions expérimentales suivies en HPLC :

Tableau II.1: Conditions expérimentales suivies en HPLC

Colonne (Phase stationnaire)	Gel de silice, C18 (250 mm×4,6mm, 5 μ m)
Débit	1 mL/min
Température	40°C
Longueur d'onde	272 nm (Paracétamol et Caféine)
Volume d'injection	10 μ L
Phase mobile (mode isocratique)	(Méthanol /Eau ultra pure) : (40% / 60%)
Temps d'acquisition	8 min
Milieu de dilution	(Méthanol /Eau ultra pure): (40% / 60%)

II.4.2. Conditions expérimentales suivies en UV-Visible:

Tableau II. 2 : Conditions expérimentales de l'UV-Visible

Le blanc	(Méthanol /Eau ultra pure): (40% / 60%)
Longueur d'onde	Caféine :272 nm Paracétamol : 244 nm
Milieu de dilution	(Méthanol /Eau ultra pure): (40% / 60%)
Température	Ambiante
Cuves	En Quartz (largeur : 10mm, trajet optique 10 mm, volume :3.5 mL)

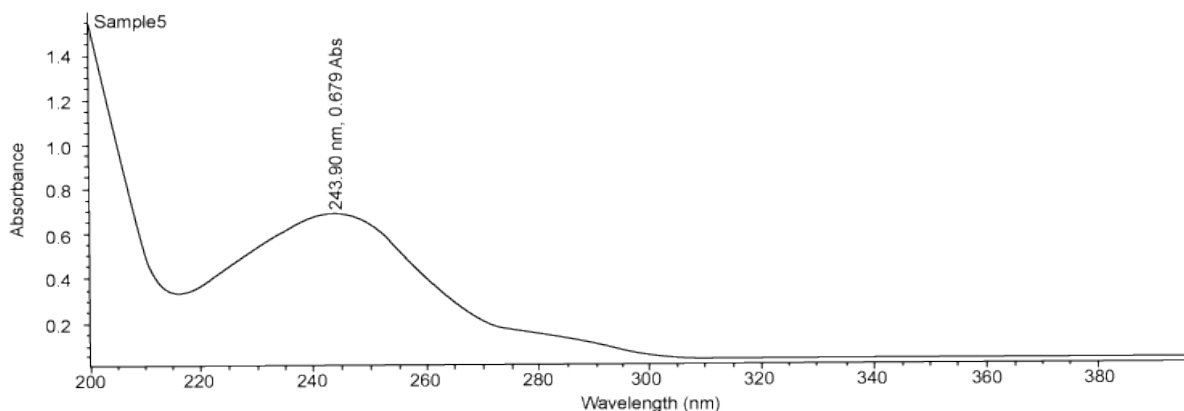


Figure II.4 : Absorbance maximale du Paracétamol

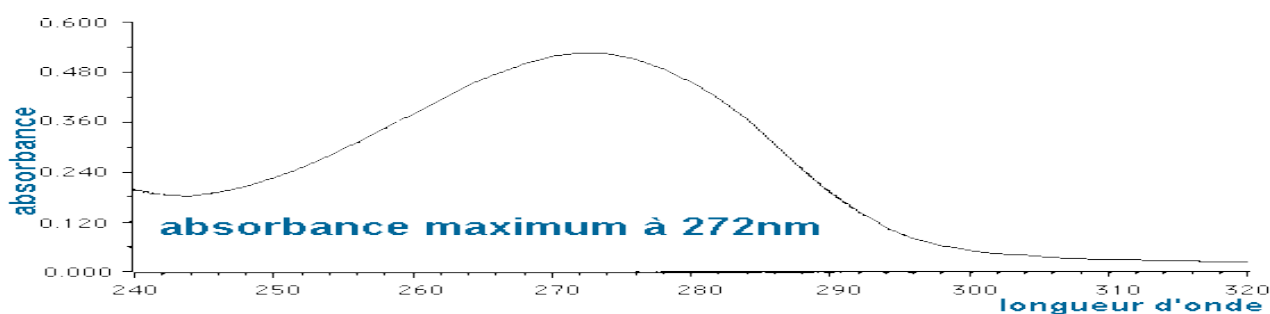


Figure II.5 : Absorbance maximale du Caféine

II.5. Optimisation des méthodes :

II.5.1. Optimisation Chromatographique :

- **Choix de la phase stationnaire :**

Pour une bonne résolution et un gain en temps et réactifs, nous avons choisi une colonne symétrique, RP C18, 250mm de longueur et 4,6 mm de diamètre interne avec une granulométrie de 5 μ m.

- **Choix de la phase mobile :**

La phase mobile choisie est simple et moins couteuse (40% méthanol, 60% eau ultra pure).

- **Choix du débit :**

Plusieurs études ont été réalisées sur le débit de la méthode allant de 1ml/min à 2ml/min, pour réduire au maximum le temps de rétention (moins de rejet et plus d'économie) tout en gardant une bonne résolution, nous avons choisi un débit de 1ml/min.

- **Choix de la température :**

L'étude de la température de la colonne a été testée sur plusieurs gammes de températures, on a constaté une bonne résolution à 40°C.

- **Choix du volume de l'injection :**

Pour une concentration de 1 mg/mL de Paracétamol et 1mg/mL de Caféine, Le volume d'injection choisi est de 10 μ L afin d'obtenir une bonne intégration des pics et avec moins d'erreurs.

- **Choix de la longueur d'onde :**

Nous avons choisi 272 nm comme valeur de la longueur d'onde qui peut être utilisée pour le dosage simultané des deux principes actifs.

- **Choix du solvant de dilution :**

Comme le Paracétamol et la Caféine sont assez solubles dans le mélange eau-méthanol, nous avons adopté ce dernier comme solvant de dilution.

II.5.2.Optimisation Spectrophotométrique :

- **Choix des cuves :**

La cuve appropriée dépend de la gamme de la longueur d'onde requise et du volume d'échantillon disponible. Les cuves en verre sont adaptées seulement à la région visible du spectre, tandis que le quartz peut être utilisé à la fois en UV et en visible. Une cuve de 10 mm contient presque 3.5 ml d'échantillon.

- **Choix du solvant de dilution :**

Pour les mêmes raisons que l'HPLC, on a choisi le mélange eau-méthanol comme solvant de dilution.

- **Choix du blanc :**

Le choix du blanc est relié avec le choix du solvant de dilution, ils doivent être identiques.

- **Choix de la longueur d'onde :**

Après un balayage de la solution standard diluée, on a trouvé que le maximum d'absorption de paracétamol est à 244 nm et celui de la caféine est à 272nm.

II.6. Mode opératoire :

II.6.1.Préparation des standards :

- **Méthode chromatographique (HPLC):**

- **Préparation de la solution mère (SM) :**

Premièrement, on pèse une masse de 25 mg de chaque étalon (Paracétamol, Caféine) puis on la met dans une fiole jaugée de 25 mL, après on complète au volume avec le solvant de dilution afin d'obtenir une concentration de 1mg/mL (solution mère SM).

Deuxièmement, on fait passer le mélange à l'ultrason pendant 20 min jusqu'à ce que toute la substance soit dissoute (éviter une augmentation de la température).
Finalement, on fait passer la solution dans un filtre en polypropylène de cellulose de porosité 0,45 μm .

- **Préparation des solutions filles (SF) :**

La seconde phase après la préparation de la solution mère consiste à préparer des solutions filles (SF) de concentrations différentes (10mg/L ,20mg/L ,30mg/L, 40mg/L ,50mg/L) dans des fioles jaugées de 25 ml.

- **Méthode spectroscopique (UV-Visible) :**

Pour la Caféine, on a utilisé les mêmes solutions de la méthode chromatographique mais pour le Paracétamol, on a préparé des solutions filles (10 mg/L, 15mg/L ,20mg/L, 25mg/L, 30mg/L) à partir d'une solution mère de 5g/L de concentration.

II.6.2 .Préparation des solutions essais :

On pèse 10 comprimés de Doliprane et de Paracétamol Mylan, puis on détermine leurs poids moyen et on les broie dans un mortier.

On ouvre 10 gélules de Lamaline et on pèse leurs contenus.

Les pesées sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

Tableau II. 3 : Les pesées de 10 comprimés / gélules des différents médicaments

Médicament	Pesée de 10 comprimés ou gélules
Doliprane	11.580 g
Paracétamol Mylan	11.000g
Lamaline	3.646g

On pèse l'équivalent de 200 mg de chaque médicament qu'on fait passer dans des fioles de 100 mL et on complète le volume avec la solution de dilution (60% eau ultra pure+40% méthanol)

On prélève 1 ml de chaque solution qu'on verse dans des fioles de 100 mL puis on complète avec la solution de dilution jusqu'au trait de jauge (une dilution 100 fois).

Chapitre III

Résultats et discussions

III.1. Validation des techniques analytiques :

III.1.1. Technique spectroscopique UV-Visible :

➤ Essai de linéarité :

À partir des mêmes solutions mères, on prépare et on analyse 3 gammes d'étalonnage pour chaque étalon.

- **Caféine :** Les résultats obtenus sont interprétés dans les graphes suivants :

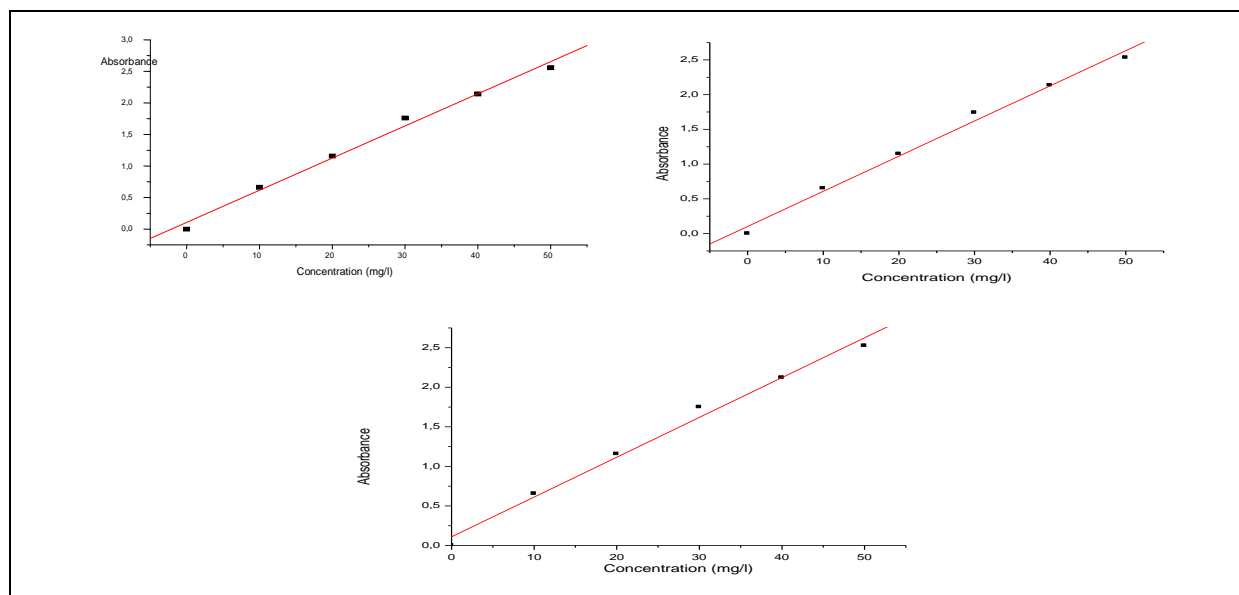


Figure III.1 : La représentation des trois gammes d'étalonnage exprimant la concentration de la caféine en fonction de l'absorbance

Tableau III.1 : Résultats du test de linéarité de la caféine

	Courbe de linéarité	Coefficient de corrélation (R)
1 ère gamme d'étalonnage	$Y=0.05095 X +0.10638$	0.99567
2 ème gamme d'étalonnage	$Y=0.05059 X +0.10262$	0.99581
3 ème gamme d'étalonnage	$Y=0.05033 X +0.10919$	0.99524

✓ Test d'homogénéité des variances

Le test de Cochran est appliqué aux variances des réponses Y_{ij} pour vérifier l'homogénéité des variances constitutives de l'erreur expérimentale. Si l'inégalité suivante est vérifiée : $C_{calculé} < C_{tabulé}$, l'ensemble des variances des différents groupes peut être considéré comme homogène au risque α (0.05).

Calcul de la variance de chaque niveau :

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2}{n-1}$$

Avec \bar{Y}_i la moyenne du niveau i

- La somme des variances des p niveaux : $\sum_{i=1}^p S_i^2$
- Recherche de la variance la plus élevée : S_{\max}^2
- Le test de Cochran

$$C = \frac{S_{\max}^2}{\sum_{i=1}^p S_i^2}$$

- Dans la table de Cochran on cherche C (α, n, p) pour le risque α de 5%.
 - p : le nombre de niveau (concentration) ; le niveau est repéré par l'indice i
 - n : le nombre de série (mesure) ; la série est repérée par l'indice j

Tableau III.2 : Test de l'homogénéité des variances

Concentration (mg/l)	Y_{ij}	\bar{Y}_{ij}	S_i^2
10	0.662 0.651 0.654	0.6556	$3.234 \cdot 10^{-5}$
20	1.158 1.146 1.156	1.1533	$4.13 \cdot 10^{-5}$
30	1.761 1.741 1.749	1.7503	$1.01335 \cdot 10^{-4}$
40	2.142 2.133 2.121	2.132	$1.11 \cdot 10^{-4}$
50	2.558 2.533 2.524	2.5383	$3.10335 \cdot 10^{-4}$

$$S_{\max}^2 = 3.10335 \cdot 10^{-4}$$

$$\sum_{i=1}^p S_i^2 = 5.9631 \cdot 10^{-4}$$

$$C_{\text{calculé}} = 0.52$$

$$C_{\text{tabulé}} = 0.684$$

$C_{\text{calculé}} < C_{\text{tabulé}} (0,05 ; 3 ; 5)$, les variances sont donc homogènes au risque α de 5%.

✓ **Test de l'existence d'une pente significative :**

Ce test consiste à comparer les variations dues à la régression et aux erreurs (expérimentales et d'ajustement). La dépendance linéaire est testée par « F » de Fisher au seuil de confiance de 95%. Si le « F » calculé est supérieur au F de la table aux degrés de liberté (1, N-2), N étant le nombre total d'observations, le test est significatif.

La moyenne des moyens (moyenne générale) : $\bar{\bar{Y}} = \frac{\sum Y_{ij}}{N}$

- Somme des carrés des écarts résiduels : $SCE_r = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y}_{ij})^2$

- Somme des carrés des écarts dus à la régression : $SCE_I = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (\bar{Y}_{ij} - \bar{\bar{Y}})^2$

- Variance résiduel : $S_r^2 = \frac{SCE_r}{N-2}$

- Variance dû à la régression : $S_I^2 = \frac{SCE_I}{1}$

Le facteur de Fischer est calculé selon la formule suivante :

$$F = \frac{S_I^2}{S_r^2}$$

Tableau III.3 : Test de l'existence d'une pente significative

Concentration (mg/l)	Y_{ij}	\bar{Y}_{ij}	$Y_{ij} - \bar{Y}_{ij}$	$(Y_{ij} - \bar{Y}_{ij})^2$	$(\bar{Y}_{ij} - \bar{\bar{Y}})^2$
10	0.662	0.6556	$6.4 \cdot 10^{-3}$	$4.096 \cdot 10^{-5}$	0.980
	0.651		$-4.6 \cdot 10^{-3}$	$2.116 \cdot 10^{-5}$	
	0.654		$-1.6 \cdot 10^{-3}$	$2.56 \cdot 10^{-6}$	
20	1.158	1.1533	$4.7 \cdot 10^{-3}$	$2.209 \cdot 10^{-5}$	0.243
	1.146		$-7.3 \cdot 10^{-3}$	$5.329 \cdot 10^{-5}$	
	1.156		$2.7 \cdot 10^{-3}$	$7.29 \cdot 10^{-6}$	
30	1.761	1.7503	0.0107	$1.1449 \cdot 10^{-4}$	0.0109
	1.741		$-9.3 \cdot 10^{-3}$	$8.649 \cdot 10^{-5}$	
	1.749		$-1.3 \cdot 10^{-3}$	$1.69 \cdot 10^{-6}$	
40	2.142	2.132	0.01	$1 \cdot 10^{-4}$	0.2363
	2.133		$1.3 \cdot 10^{-3}$	$1.69 \cdot 10^{-6}$	
	2.121		-0.011	$1.21 \cdot 10^{-4}$	
50	2.558	2.5383	0.0197	$3.8809 \cdot 10^{-4}$	0.7964
	2.533		$-5.3 \cdot 10^{-3}$	$5.3 \cdot 10^{-6}$	
	2.524		-0.0143	$2.0449 \cdot 10^{-4}$	

$$\bar{\bar{Y}} = 1.6459$$

$$SCE_r = 8.392 \cdot 10^{-4} \quad SCE_I = 2.2666$$

$$F_{\text{calculé}} = 35111.77$$

$$F_{\text{tabulé}} = 4.67$$

Selon le test de Fisher , $F_{\text{calculé}} > F_{\text{tabulé}} (F_{(5\%,1,13)})$, nous pouvons conclure l'existence d'une pente significative pour la caféine.

- **Paracétamol** : les résultats obtenus sont interprétés dans les graphes suivants

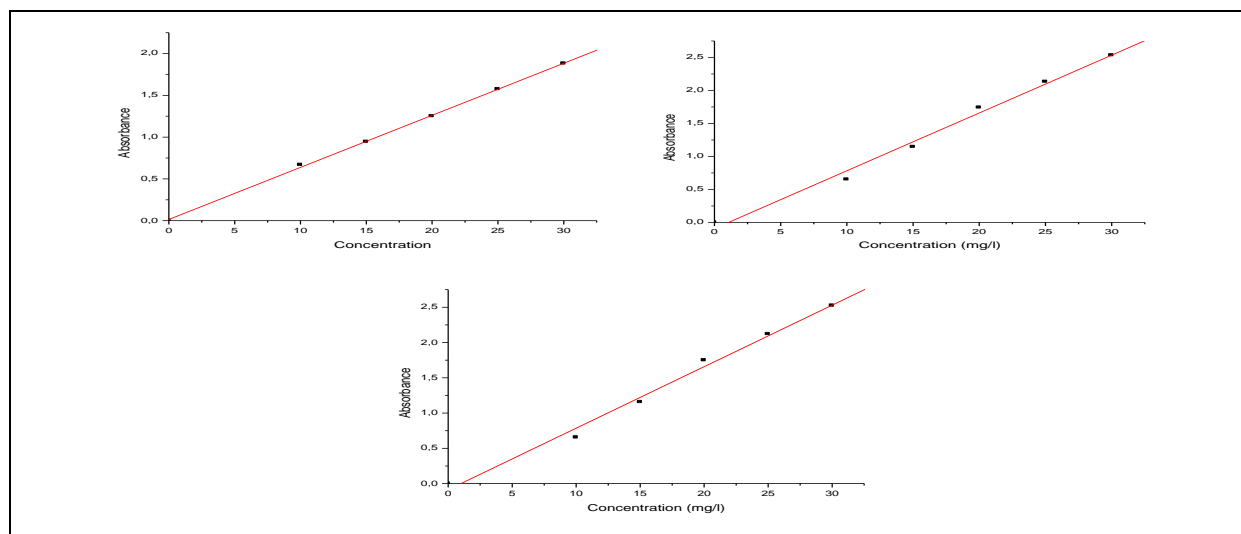


Figure III.2 : La représentation des trois gammes d'étalonnage exprimant la concentration du Paracétamol en fonction de l'absorbance

Tableau III.4 : Résultats du test de linéarité de Paracétamol

	Courbe de linéarité	Coefficient de corrélation (R)
1 ère gamme d'étalonnage	$Y=0.06231 X + 0.01507$	0.99971
2 ème gamme d'étalonnage	$Y=0.0876 X-0.09271$	0.99559
3 ème gamme d'étalonnage	$Y=0.087214 X +0.08614$	0.99572

✓ **Test d'homogénéité des variances :**

Tableau III.5 : Test de l'homogénéité des variances

Concentration	Y_{ij}	\bar{Y}_{ij}	S^2_i
10	0.669 0.67 0.662	0.667	$1.5 \cdot 10^{-5}$
15	0.945 0.948 0.945	0.946	$3 \cdot 10^{-6}$
20	1.251 1.248 1.253	1.25	$7 \cdot 10^{-6}$
25	1.574 1.569 1.578	1.57266	$2.18534 \cdot 10^{-5}$
30	1.882 1.887 1.879	1.88266	$1.63334 \cdot 10^{-5}$

$$S^2_{\max} = 2.18534 \cdot 10^{-5}$$

$$\sum_{i=1}^p s_i^2 = 6.31868 \cdot 10^{-5}$$

$$C_{\text{calculé}} = 0.345$$

$$C_{\text{tabulé}} = 0.684$$

$C_{\text{calculé}} < C_{\text{tabulé}}$ (0,05 ;3; 5), les variances sont donc homogènes au risque α de 5%.

✓ Test de l'existence d'une pente significative :

Tableau III.6 : Test de l'existence d'une pente significative

Concentration	Y_{ij}	\bar{Y}_{ij}	$Y_{ij} - \bar{Y}_{ij}$	$(Y_{ij} - \bar{Y}_{ij})^2$	$(\bar{Y} - \bar{\bar{Y}})^2$
10	0.669	0.667	$2 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-6}$	0.3564
	0.67		$3 \cdot 10^{-3}$	$9 \cdot 10^{-6}$	
	0.662		$-5 \cdot 10^{-3}$	$2.5 \cdot 10^{-5}$	
15	0.945	0.946	$-1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-6}$	0.1011
	0.948		$2 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-6}$	
	0.945		$-1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-6}$	
20	1.251	1.25	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$1.96 \cdot 10^{-4}$
	1.248		$-2 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-6}$	
	1.253		$3 \cdot 10^{-3}$	$9 \cdot 10^{-6}$	
25	1.574	1.57266	$1.34 \cdot 10^{-3}$	$1.7956 \cdot 10^{-6}$	0.0953
	1.569		$-3.66 \cdot 10^{-3}$	$1.33956 \cdot 10^{-5}$	
	1.578		$5.34 \cdot 10^{-3}$	$2.85156 \cdot 10^{-5}$	
30	1.882	1.88266	$-6.6 \cdot 10^{-4}$	$4.356 \cdot 10^{-7}$	0.3827
	1.887		$4.34 \cdot 10^{-3}$	$1.88356 \cdot 10^{-5}$	
	1.879		$-3.66 \cdot 10^{-3}$	$1.33956 \cdot 10^{-5}$	

$$\bar{\bar{Y}} = 1.264$$

SCEr

SCE_i

$$= 3.508 \cdot 10^{-4}$$

$$= 2.2666$$

$$F_{\text{calculé}} = 83996$$

$$F_{\text{tabulé}} = 4.67$$

Selon le test de Fisher, $F_{\text{calculé}} > F_{\text{tabulé}}$ ($F_{(5\%, 1, 13)}$), nous pouvons conclure l'existence d'une pente significative pour le Paracétamol.

D'après ces résultats, on constate que la linéarité est validée pour les deux principes actifs.

En traçant les courbes d'étalonnages et mesurant les absorbances de chaque médicament on a pu calculer les masses des principes actifs, les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

Tableau III.7 : Pesées des principes actifs calculées

Médicament +principe actif	Absorbance	Masse du principe actif indiquée sur la boîte (mg)	Masse du principe actif calculée (par comprimé ou gélule) (mg)
Lamaline (caféine+paracétamol)	Paracétamol : 1.425 Caféine : 0.53	Paracétamol : 300 Caféine : 30	Paracétamol : 412 Caféine : 15
Doliprane (paracétamol)	0.951	1000	870
Paracétamol mylan (paracétamol)	1.42	1000	1240

➤ **Essais de répétabilité :**

L'analyse est faite sur trois gammes d'étalonnages différentes. Chaque gamme présente cinq concentrations étudiées d'une manière répétitive. Pour cela, nous avons calculé la moyenne (m) et l'écart type (σ) afin de calculer le coefficient de variation (C.V) selon la formule suivante :

$$CV = \frac{\sigma}{m} * 100$$

• **Caféine :**

Tableau III.8 : Résultats du test de répétabilité de la Caféine

Concentration (mg/l)	Absorbance			M	σ	CV %
	1 ère gamme d'étalonnage	2eme gamme d'étalonnage	3ème gamme d'étalonnage			
10	0.662	0.651	0.654	0.65566	0.0046428	0.708
20	1.158	1.146	1.156	1.15333	0.0052493	0.455
30	1.761	1.741	1.749	1.75033	0.0082192	0.469
40	2.142	2.133	2.121	2.132	0.0086023	0.403
50	2.558	2.533	2.524	2.53833	0.0143836	0.566

Moyenne des $\sigma = 8.22 * 10^{-3}$
--

- **Paracétamol :**

Tableau III.9 : Résultats du test de répétabilité du Paracétamol

Concentration (mg/l)	Absorbance			M	σ	CV %
	1 ère gamme d'étalonnage	2eme gamme d'étalonnage	3eme gamme d'étalonnage			
10	0.669	0.67	0.662	0.667	0.0035590	0.53
15	0.945	0.948	0.945	0.946	0.0014142	0.149
20	1.251	1.248	1.253	1.25	0.0021602	0.172
25	1.574	1.569	1.575	1.57266	0.0026246	0.166
30	1.882	1.887	1.879	1.88266	0.0032998	0.175

Moyenne des $\sigma = 2.61 * 10^{-3}$
--

Référence certifiée : C.V < 2%
--

D'après ces résultats on constate que le C.V appartient au domaine de référence certifiée donc la répétabilité est bien validée.

➤ **Limite de détection (LD) :**

$LD = 3.3 \frac{\sigma}{S}$

σ : la somme des écarts types

S : la pente de la courbe d'étalonnage

Caféine : LD= 0.563 mg/l

Paracétamol : LD=0.138 mg/l

➤ **Limite de quantification (LQ) :**

$LQ = 10 \frac{\sigma}{S}$

Caféine : LQ=1.62 mg/l

Paracétamol : LQ=0.418 mg/l

III.1.2. Technique chromatographique HPLC :

➤ Essai de linéarité :

À partir de la même solution mère, on prépare et on analyse 3 gammes d'étalonnage.

- **Caféine** : Les résultats obtenus sont interprétés dans les graphes suivants :

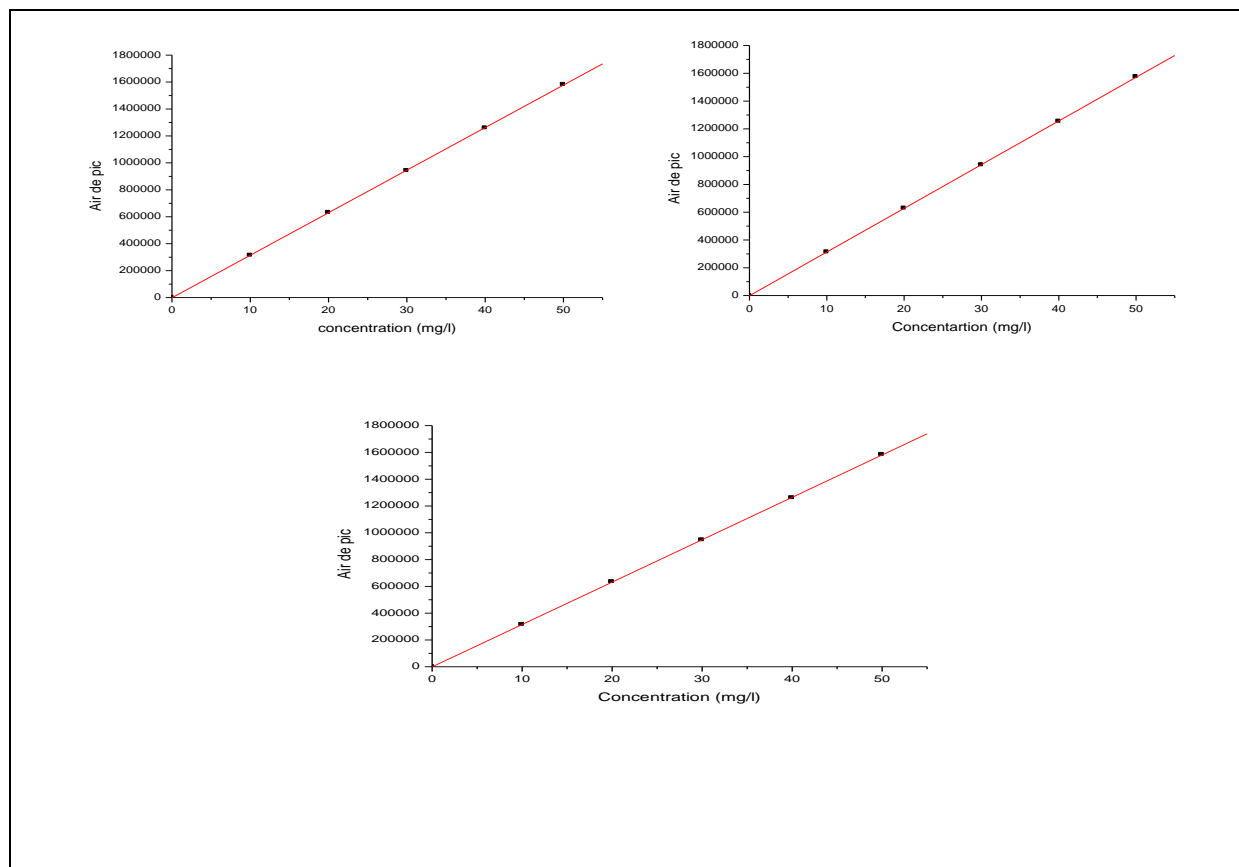


Figure III.3 : La représentation des trois gammes d'étalonnage exprimant la concentration de la Caféine en fonction de l'aire de pic.

Tableau III.10 : Résultats du test de linéarité de la caféine

	Courbe de linéarité	Coefficient de corrélation (R)
1 ère gamme d'étalonnage	$Y = 31580.18971 X - 1475.60952$	0.99999
2ème gamme d'étalonnage	$Y = 31453.95371 X - 1287.67619$	0.99999
3ème gamme d'étalonnage	$Y = 31631.71286 X - 767.30476$	0.99999

✓ **Test d'homogénéité des variances :**

Tableau III.11 : Test de l'homogénéité des variances

Concentration	Y_{ij}	\bar{Y}_{ij}	S_i^2
10	313774.1 312986.5 314842.9	313867.8333	868144.6933
20	631337.9 628476.2 634289.4	631367.8333	8448995.563
30	943035.7 940122.8 946207.3	943121.9333	9260862.203
40	1258722.3 1253855.4 1260250.6	1257609.433	11153499.92
50	1581304.8 1574926.1 1584580.9	1580270.6	24105967.99

$S_{\max}^2 = 24105967.99$
 $\sum_{i=1}^p s_i^2 = 53837470.37$

$C_{\text{calculé}} = 0.448$
 $C_{\text{tabulé}} = 0.684$

$C_{\text{calculé}} < C_{\text{tabulé}} (0,05 ; 3 ; 5)$, les variances sont donc homogènes au risque α de 5%.

✓ **Test de l'existence d'une pente significative :**

Tableau III.12 : Test de l'existence d'une pente significative

Concentration	Y_{ij}	\bar{Y}_{ij}	$Y_{ij} - \bar{Y}_{ij}$	$(Y_{ij} - \bar{Y}_{ij})^2$	$(\bar{Y} - \bar{\bar{Y}})^2$	
10	313774.1 312986.5 314842.9	313867.8333	-93.7333 -881.333 975.067	8785.931529 776747.8569 950755.6545	$3.986 \cdot 10^{11}$	
20	631337.9 628476.2 634289.4	631367.8333	-29.9333 -2891.633 2921.5667	896.0024489 8361543.142 8535551.953		$9.852 \cdot 10^{10}$
30	943035.7 940122.8 946207.3	943121.9333	-86.2333 -2999.133 3085.3667	7436.182029 8994800.551 9519487.673		$4.52 \cdot 10^6$
40	1258722.3 1253855.4 1260250.6	1257609.433	1112.867 -3754.033 2641.167	1235472.96 14092763.77 6975763.122	$9.76 \cdot 10^{10}$	
50	1581304.8 1574926.1 1584580.9	1580270.6	1034.2 -5344.5 4310.3	1069569.64 28563680.25 18578686.09	$4.03 \cdot 10^{11}$	

$\bar{\bar{Y}} = 945247.5266$

$SCE_r = 107671940.8$ $SCE_i = 9.98 \cdot 10^{11}$

$$F_{\text{calculé}} = 120462$$

$$F_{\text{tabulé}} = 4.67$$

Selon le test de Fisher, $F_{\text{calculé}} > F_{\text{tabulé}} (F_{(5\%,1,13)})$, nous pouvons conclure l'existence d'une pente significative pour la Caféine.

- Paracétamol :
- Essai de linéarité :

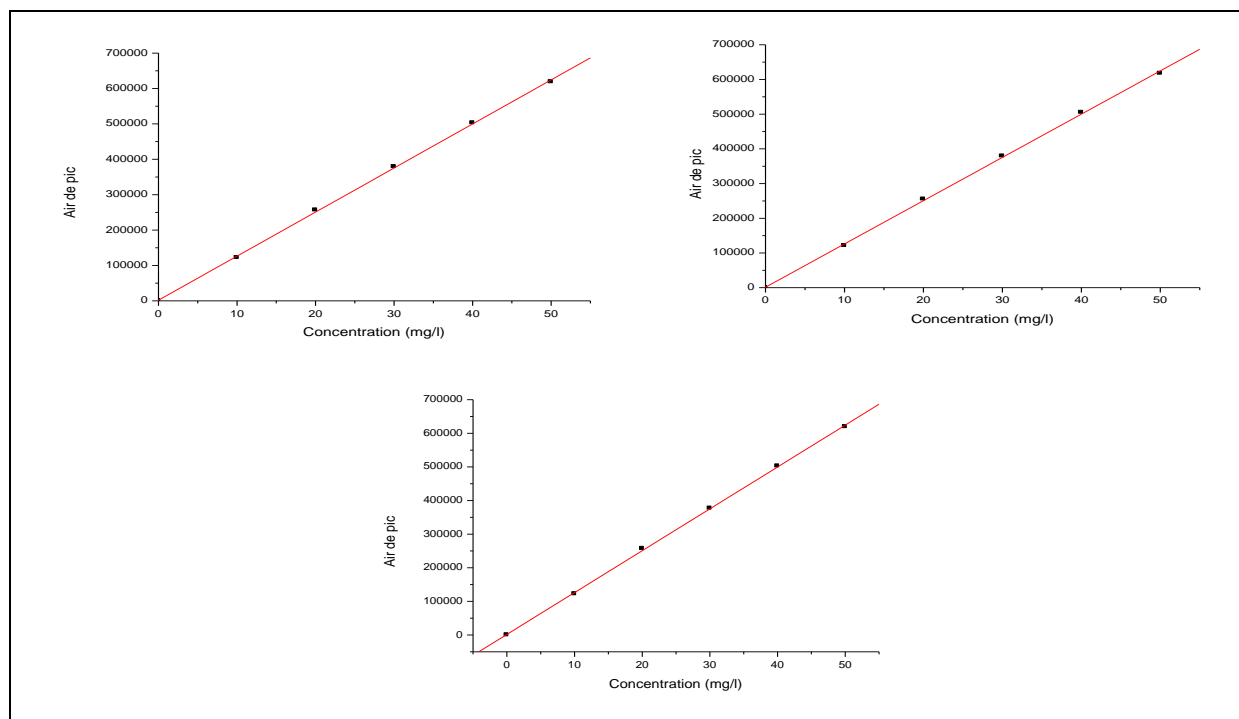


Figure III.4 : Représentation des trois gammes d'étalonnages exprimant la concentration du Paracétamol en fonction de l'aire de pic

Tableau III.13 : Résultats du test de linéarité de Paracétamol

	Courbe de linéarité	Coefficient de corrélation (R)
1 ère gamme d'étalonnage	$Y = 12450.55543 X + 1825.28095$	0.9998
2ème gamme d'étalonnage	$Y = 12466.84829 X + 1382.27619$	0.9997
3ème gamme d'étalonnage	$Y = 12449.93171 X + 1773.42381$	0.9998

✓ **Test d'homogénéité des variances :**

Tableau III.14 : Test d'homogénéité des variances

Concentration	Y_{ij}	\bar{Y}_{ij}	S^2_i
10	121935.9	121723.8667	220645.1233
	121185.5		
	122050.2		
20	256456.2	256344.7333	1068982.973
	255259.6		
	257318.4		
30	378858.6	378347.9667	1417579.503
	379198.1		
	376987.2		
40	502660.9	503435	2311965.67
	505186.8		
	502457.3		
50	618623.4	618477.1667	849881.0633
	617490.9		
	619317.2		

$S^2_{\max} = 2311965.67$

$\sum_{i=1}^p s_i^2 = 4906970.333$

$C_{\text{calculé}} = 0.471$

$C_{\text{tabulé}} = 0.684$

$C_{\text{calculé}} < C_{\text{tabulé}} (0,05 ; 3 ; 5)$, les variances sont donc homogènes au risque α de 5%.

✓ **Test de l'existence d'une pente significative :**

Tableau III.15 : Test de l'existence d'une pente significative

Concentration (mg/l)	Y_{ij}	\bar{Y}_{ij}	$Y_{ij} - \bar{Y}_{ij}$	$(Y_{ij} - \bar{Y}_{ij})^2$	$(\bar{Y} - \bar{\bar{Y}})^2$
10	121935.9	121723.8667	212.0333	44958.12	$6.45 \cdot 10^{10}$
	121185.5		-538.37	289838.7	
	122050.2		326.33	106493.42	
20	256456.2	256344.7333	111.47	12425.56	$1.42 \cdot 10^{10}$
	255259.6		-1085.13	1177507.12	
	257318.4		973.67	948033.27	
30	378858.6	378347.9667	510.63	260743	$7.19 \cdot 10^6$
	379198.1		850.10	722670.01	
	376987.2		-1360.77	1851686.012	
40	502660.9	503435	-774.1	599230.81	$1.63 \cdot 10^{10}$
	505186.8		1751.8	3068803.24	
	502457.3		-977.7	955897.29	
50	618623.4	618477.1667	146.23	21383.21	$5.9 \cdot 10^{10}$
	617490.9		-986.27	972728.51	
	619317.2		840.03	705650.40	

$\bar{\bar{Y}} = 375665.75$

$SCE_r = 11744048.67$

$SCE_l = 1.54 \cdot 10^{11}$

$$F_{\text{calculé}} = 170469.3$$

$$F_{\text{tabulé}} = 4.67$$

Selon le test de Fisher, $F_{\text{calculé}} > F_{\text{tabulé}} (F_{(5\%,1,13)})$, nous pouvons conclure l'existence d'une pente significative pour le Paracétamol .

D'après ces résultats on constate que la linéarité est validée.

En traçant les courbes d'étalonnages et injectant dans l'HPLC les solutions contenant les différents médicaments, on a pu calculer les masses des principes actifs qui sont comme suit :

Tableau III.16 : Pesées des principes actifs calculées

Médicament	Concentration de la solution injectée (mg/l)	Masse calculée (mg/comprimé)
Lamaline (Paracétamol+Caféine)	P : 17.11849 C : 10.6	P : 312.15 C : 19.29
Doliprane (Paracétamol)	13.95003	807
Paracétamol Mylan (Paracétamol)	22.774	1138

➤ **Essai de répétabilité :**

- **Caféine :**

Tableau III.17 : Résultats du test de répétabilité de la caféine

Concentration (mg/l)	Air du pic			M	Σ	CV %
10	313774.1	312986.5	314842.9	313867.8333	760.7648315	0.24
20	631337.9	628476.2	634289.4	631367.8333	2373.323347	0.3759
30	943035.7	940122.8	946207.3	943121.9333	2884.735023	0.2634
40	1258722.3	1253855.4	1260250.6	1257609.433	2726.841876	0.216
50	1581304.8	1574926.1	1584580.9	1580270.6	4008.82094	0.253

- **Paracétamol :**

Moyenne des $\sigma=2550.89$

Tableau III.18 : Résultats du test de répétabilité du Paracétamol

Concentration (mg/l)	Air du pic			M	Σ	CV %
10	121935.9	121185.5	122050.2	121723.8667	383.5254762	0.315
20	256456.2	255259.6	257318.4	256344.7333	844.1891468	0.329
30	378858.6	379198.1	376987.2	378347.9667	972.1383658	0.256
40	502660.9	505186.8	502457.3	503435	1241.495246	0.246
50	618623.4	617490.9	619317.2	618477.1667	752.7199848	0.121

Moyenne des $\sigma=839.216$

Les C.V des deux étalons appartiennent au domaine de référence certifiée donc la répétabilité est bien validée.

➤ **Limite de Détection (LD) et de Quantification (LQ) :**

• **Caféine :**

LD=0.267 mg/L

LQ=0.80 mg/L

• **Paracétamol :**

LD=0.22 mg/L

LQ=0.67 mg/L

Conclusion :

Les résultats issus des méthodes analytiques ont un rôle essentiel dans de nombreux domaines suite aux décisions qui sont prises sur leur base telles que la détermination de la qualité des principes actifs, des spécialités pharmaceutiques, des nutriments ou autres échantillons tels que ceux d'origine biologique impliqués dans les études pharmacocinétiques ou de biodisponibilité et bioéquivalence. La fiabilité des résultats analytiques est primordiale dans ce contexte, et surtout ils doivent être en accord avec les besoins des utilisateurs finaux. Pour s'assurer de la fiabilité des résultats qui seront fournis lors des analyses de routine, la validation des méthodes analytiques est un élément crucial du cycle de vie d'une méthode analytique.

Ce travail qui a été réalisé au laboratoire de recherche chimie physique et d'électrochimie, a pour objectif le dosage de paracétamol et de la caféine dans un médicament, par deux méthodes de dosage qui sont l'HPLC et l'UV-Visible qui sont des techniques simples et rapides, capables de doser le paracétamol et la caféine dans la matière première et dans les produits finis étudiés (comprimé et gélule), donc après un dosage des trois différents médicaments on a trouvé une différence entre les masses calculées et celles indiquées sur la boîte.

Nous avons développé une méthode spécifique, linéaire, exacte et fidèle.

L'optimisation des conditions de séparation par la méthode HPLC a été faite selon une approche multi-variantes. Il a été basé sur sept facteurs, le choix de la phase mobile, de la phase stationnaire, du débit, de la température, du volume d'injection, de solvant de dilution et de la longueur d'onde.

La validation de cette méthode est basée sur l'utilisation d'une méthodologie statistique (test Cochran, test et test de Fisher).

La deuxième étape a été consacrée à la validation analytique de cette méthode. La validation classique a été appliquée avec succès pour démontrer la capacité de la méthode à identifier et à quantifier les deux principes actifs (le paracétamol et la caféine) dans la matière première et le produit fini.

Les critères de la validation (linéarité, répétabilité) examinés ont été acceptables.

Nous avons aussi procédé à son application sur les deux formes pharmaceutiques et nous avons obtenu des résultats très satisfaisants.

Références bibliographiques :

- [1] GIMENEZ F, BRUNETON C, NARONG RITH D. Etude de la qualité des médicaments vendus et dispensés au Cambodge. *Méd et Mal. Infect.* 1997, 27, 541-544.
- [2] OMS, Mondialisation et accès aux médicaments-série. *Economie de la santé et Médicament.* 1999 :p 118, N07.
- [3] Vulgaris-médical, le médicament
<http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie/medicament-5351.html>. 19 janvier 2013.
- [4] <http://www.linternaute.com/dictionnaire/fr/definition/principe-actif/>
- [5] Chandra R, Sharma K D. quantitative determination of paracetamol and caffeine from formulated tablets by reversed phase-hplc separation technique. *International journal of chromatographic science*, 2013:p31.
- [6] <http://matieres scientifiques.fr/terminale-S/chimie/spectrophotometrie/fiche-de-cours/fiche-spectrophotometrie.html>
- [7] <http://player.slideplayer.fr/46/11699658/#>
- [8] Gerber F; Krummen M; Potgeter H, Roth, A, Siffrin C, Spöndlin C. (2004). Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3µm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice. *Journal of Chromatography A.* 1036 (2): 127–133. PMID 15146913. doi:10.1016/j.chroma.2004.02.056
- [9] Douglas A, Skoog F, James Holler, Timothy A. Nieman-Principes d'analyse instrumentale. 5^{ème} édition. Amérique: de boeck, 2003:p725.
- [10] Chandra R, Dutt K. Sharma Department of Pharmaceutical Chemistry, Dolphin P.G. Institute of Biomedical and Natural Sciences, Dehradun-248001, Uttarakhand, INDIA, 2013.
- [11] Chandra R, Dutt K. Sharma Department of Pharmaceutical Chemistry, Dolphin P.G. Institute of Biomedical and Natural Sciences, Dehradun-248001, Uttarakhand, INDIA, 2013.
- [12] Nussbaumer S. Analyse de médicament produits en milieu hospitalier : application aux composés non-UV absorbant cytotoxique. Centre d'édition des hôpitaux universitaires de Genève, N°4332/20011-217.
- [13] Reginald H, Charles M, Biochimie. 2^{ème} édition. Amérique: de boeck. 2000:p157.
- [14] Liguori A et al. Absorption and subjective effects of caffeine from coffee, cola and Capsules. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997 :p58; 721-726.
- [15] Organisation mondiale de la santé Genève : assurance de la qualité des produits pharmaceutiques. Recueil de directives et autres documents, 1989 :p1 ;278 .

ANNEXE

Table de Fisher

$v_1 \rightarrow$										
$v_2 \downarrow$	1	2	3	4	5	6	8	12	24	∞
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	238,9	243,9	249,0	254,3
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,37	19,41	19,45	19,50
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,84	8,74	8,64	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,04	5,91	5,77	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,82	4,68	4,53	4,36
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,15	4,00	3,84	3,67
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,73	3,57	3,41	3,23
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,44	3,28	3,12	2,93
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,23	3,07	2,90	2,71
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,07	2,91	2,74	2,54
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	2,95	2,79	2,61	2,40
12	4,75	3,88	3,49	3,26	3,11	3,00	2,85	2,69	2,50	2,30
13	4,67	3,80	3,41	3,18	3,02	2,92	2,77	2,60	2,42	2,21
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,70	2,53	2,35	2,13
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,64	2,48	2,29	2,07
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,59	2,42	2,24	2,01
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,55	2,38	2,19	1,96
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,51	2,34	2,15	1,92
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,48	2,31	2,11	1,88
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,45	2,28	2,08	1,84
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,42	2,25	2,05	1,81
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,40	2,23	2,03	1,78
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,38	2,20	2,00	1,76
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,36	2,18	1,98	1,73
25	4,24	3,38	2,99	2,76	2,60	2,49	2,34	2,16	1,96	1,71
26	4,22	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,32	2,15	1,95	1,69
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,30	2,13	1,93	1,67
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,44	2,29	2,12	1,91	1,65
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,54	2,43	2,28	2,10	1,90	1,64
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,27	2,09	1,89	1,62
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,18	2,00	1,79	1,51
60	4,00	3,15	2,76	2,52	2,37	2,25	2,10	1,92	1,70	1,39
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,17	2,01	1,83	1,61	1,25
∞	3,84	2,99	2,60	2,37	2,21	2,09	1,94	1,75	1,52	1,00

Table de Cochran

<i>n</i>	2		3		4		5		6	
	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%
2			0.995	0.975	0.979	0.939	0.959	0.906	0.937	0.877
3	0.993	0.967	0.942	0.871	0.883	0.798	0.834	0.746	0.793	0.707
4	0.968	0.906	0.864	0.768	0.781	0.684	0.721	0.629	0.676	0.590
5	0.928	0.841	0.788	0.684	0.696	0.598	0.633	0.544	0.588	0.506
6	0.883	0.781	0.722	0.616	0.626	0.532	0.564	0.480	0.520	0.445
7	0.838	0.727	0.664	0.561	0.568	0.480	0.508	0.431	0.466	0.397
8	0.794	0.680	0.615	0.516	0.521	0.438	0.463	0.391	0.423	0.360
9	0.754	0.638	0.573	0.478	0.481	0.403	0.425	0.358	0.387	0.329
10	0.718	0.602	0.536	0.445	0.447	0.373	0.393	0.331	0.357	0.303
11	0.684	0.570	0.504	0.417	0.418	0.348	0.366	0.308	0.332	0.281
12	0.653	0.541	0.475	0.392	0.392	0.326	0.343	0.288	0.310	0.262
13	0.624	0.515	0.450	0.371	0.369	0.307	0.322	0.271	0.291	0.243
14	0.599	0.492	0.427	0.352	0.349	0.291	0.304	0.255	0.274	0.232
15	0.575	0.471	0.407	0.335	0.332	0.276	0.288	0.242	0.259	0.220

